

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij- Biotehnologija

Ana Gukov

7182/BT

ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTA KVASCEM KATALIZIRANA
REDUKCIJA 1-(3,4-DIMETILFENIL)ETANONA U PRIRODNIM
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Zelena otapala za zelene tehnologije

Mentor: doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Zagreb, 2018.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Marini Cvjetko Bubalo na razumijevanju i pomoći tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala i Manuli Panić, mag.ing. koja mi je svojim stručnim znanjem i brojnim savjetima pomogla pri pisanju i izradi ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski stručni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Ultrazvukom potpomognuta kvascem katalizirana redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u prirodnim eutektičkim otapalima

Ana Gukov, 0058208182

Sažetak: Prirodna eutektička otapala se posljednjih godina istražuju kao moguća zamjena za sveprisutna hlapiva organska otapala u industriji, dok se biokatalizatori nastoje koristiti umjesto klasične kemijske sinteze zbog bolje kemo- regio- i stereoselektivnosti te utjecaja na okoliš. Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene cijelih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatora za enantioselektivnu redukciju 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida. Također, ispitan je i utjecaj predtretmana stanica kvasca ultrazvukom na iskorištenje reakcije i stereoselektivnost biokatalizatora. S obzirom na praćene parametre, iskorištenje i enantiomerni višak može se zaključiti da predtretman biokatalizatora ultrazvukom pozitivno djeluje na uspješnost enantioselektivne redukcije.

Ključne riječi: biotransformacije, kvasac, prirodna eutektička otapala, ultrazvuk, 1-(3,4-dimetilfenil)etanon

Rad sadrži: 28 stranica, 13 slika, 5 tablica, 38 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag.ing.

Datum obrane: 9. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for technology and application of cells and biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Ultrasound-assisted reduction of 1-(3,4-dimethylphenyl)ethanone catalysed by yeast in natural deep eutectic solvents

Ana Gukov, 0058208182

Abstract: Natural deep eutectic solvents have been explored over the last few years as a possible substitute for ubiquitous volatile organic solvents in the industry, while biocatalysts are trying to use instead of classical chemical synthesis due to better chemo- regio- and stereoselectivity and environmental impact. The aim of this study was to examine the possibility of using whole yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* as biocatalysts for enantioselective reduction of 1-(3,4-dimethylphenyl)ethanone in choline chloride-based natural deep eutectic solvents. Also, the influence of ultrasound pretreatment on yeast cells on the reaction yield and the biocatalyst stereoselectivity was investigated. Given the observed parameters, the yield and enantiomeric excess, it can be concluded that ultrasound pretreatment of the biocatalyst positively affects the efficiency of enantioselective reduction.

Keywords: biotransformations, natural deep eutectic solvents, ultrasound, yeast, 1-(3, 4-dimethylphenyl)ethanone

Thesis contains: 28 pages, 13 figures, 5 tables, 38 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Marina Cvjetko Bubalo, Assistant professor

Technical support and assistance: Manuela Panić, M. Eng

Defence date: July 9th 2018

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	2
2.1 Zelena kemija	2
2.2 Zelena otapala	2
2.2.1 Prirodna eutektička otapala	3
2.3 Biotransformacije	5
2.3.1 Biokatalizatori u biotransformacijama	7
2.3.1.1 Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kao biokatalizator	9
2.3.2 Primjena ultrazvuka u biotransformacijama	9
3. Eksperimentalni dio.....	12
3.1 Materijali	12
3.1.1 Kemikalije	12
3.1.2 Biokatalizator	12
3.1.3 Oprema i uređaji.....	12
3.2 Metode rada	12
3.2.1 Priprema prirodnih eutektičkih otapala.....	12
3.2.2 Enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirana pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
3.2.2.1 Određivanje koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona	16
3.2.2.2 Izrada baždarnog dijagrama	17
3.2.3. Predtretman pekarskog kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ultrazvukom u najpogodnijem prirodnom eutektičkom otapalu	17
4. Rezultati i rasprava	19
4.1 Priprava prirodnih eutektičkih otapala	20
4.2 Enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirana pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
4.3 Predtretman ultrazvukom i enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirana pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
5. Zaključci	25
6. Popis literature	26

1. Uvod

Posljednjih godina onečišćenje okoliša predstavlja sve veći problem. Stoga, akademska zajednica i industrija intenzivno razmatraju kako raspolagati prirodnim resursima Zemlje (što obuhvaća neobnovljive izvore kao naftu, ali i čistu vodu, zrak i dr.) i poboljšati postojeće odnosno osmisliti nove proizvodne procese kako bi bili prihvatljivi za okoliš. Stoga zelena kemija ima sve veći značaj za održivi razvoj s ciljem smanjenja onečišćenja okoliša uzrokovanih tehnološkim procesima uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje (Kudlak i sur., 2015). U sklopu zelene kemije provode se brojna istraživanja usmjerena na upotrebu alternativnih izvora energije i zamjenu hlapivih organskih otapala zelenim otapalima kao i zamjenu kemijske sinteze biokatalizom. Prema načelima zelene kemije, idealno otapalo trebalo bi biti netoksično, kemijski i fizički stabilno, imati nisku hlapljivost i mogućnost višekratne uporabe te biti jednostavno za rukovanje (Cvjetko, 2012). Zbog svojstava poput nehlapljivosti i nezapaljivosti, posljednjih se godina intenzivno izučavaju prirodna eutektička otapala kao moguća nova zelena otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a; Kudlak i sur., 2015; Paiva i sur., 2014). Osnovne karakteristike tih otapala su laka priprema, biorazgradivost, nehlapljivost, nezapaljivost, velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost, kao i niska cijena. Budući da je broj mogućih kemijskih struktura ovih otapala iznimno velik, mogućnost njihova dizajniranja za specifične namjene čini ih vrlo zanimljivim za uporabu u različitim granama industrije te se istražuju potencijalne primjene ovih otapala u organskim sintezama, elektropoliranju, proizvodnji polimera, procesima separacije i ekstrakcije organskih i anorganskih komponenata, proizvodnji biodizela, kao i u biotransformacijama za dobivanje industrijski važnih organskih spojeva.

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene cijelih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatora za enantioselektivnu redukciju 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u različitim prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida kao i ispitati utjecaj predtretmana biokatalizatora ultrazvukom na uspješnost asimetrične redukcije.

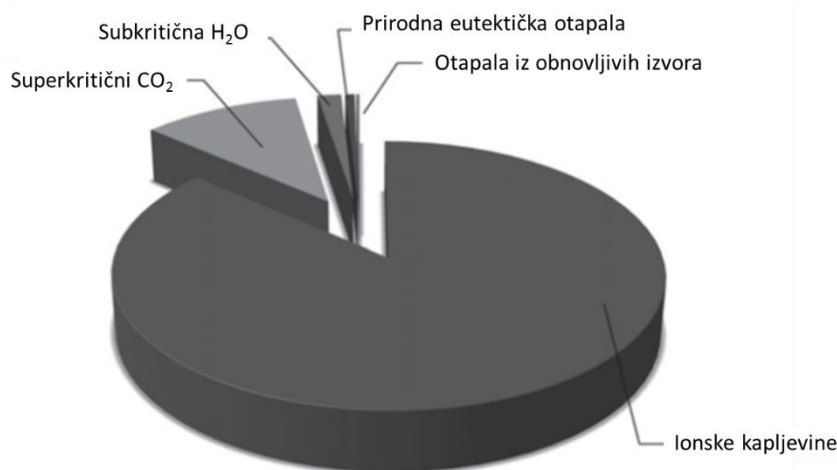
2. Teorijski dio

2.1 Zelena kemija

Zelena kemija temelji se na 12 načela koja su osmislili Paul Anastas i John Warner 1998. godine. Načela govore o smanjenju ili uklanjanju opasnih štetnih tvari iz sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih produkata te povećanju sigurnosti kemijskih procesa (Grogan, 2009b; Jukić i sur., 2004). Bit zelene kemije je proizvesti maksimalnu količinu korisnog produkta (atomska ekonomija) te svesti količinu otpada na minimum. Proces pritom mora biti siguran za radnike i okoliš, energetski učinkovit, moraju se koristiti neopasne i obnovljive sirovine gdje god je to moguće te proizvesti netoksični produkti uz što manju količinu nusproizvoda (Lancaster, 2002). U provođenju procesa prema načelima zelene kemije nemoguće je udovoljiti zahtjevima svih 12 načela, ali se u svim stupnjevima sinteze nastoji primijeniti što veći broj načela (Grogan, 2009b; Jukić i sur., 2004). Zelena kemija je relativno novo područje kemije koje se pojavilo zbog potrebe smanjenja opasnih učinaka kemikalija na ljudsko zdravlje i okoliš. Ovaj pokret za implementaciju održivog razvoja u kemijske tehnologije utemeljen je 1990-ih od strane Američke agencije za zaštitu okoliša (engl. *United States Environmental Protection Agency, US EPA*) s ciljem da se dizajniranjem kemijskih proizvoda i procesa smanji ili potpuno ukloni primjena škodljivih i opasnih tvari (Cvjetko, 2012).

2.2 Zelena otapala

U industrijskim procesima najčešće se koriste organska otapala, međutim ona čine gotovo 60% svih industrijskih emisija i 30% svih emisija hlapljivih spojeva. Za katalitičke reakcije se kao medij najčešće koristi voda. Glavni razlozi su njena niska cijena, lako zbrinjavanje nakon procesa, netoksičnost, nezapaljivost i široka dostupnost. Budući da je voda nepovoljno otapalo u gotovo svim industrijski važnim biotransformacijama (organski spojevi od komercijalnog interesa slabo su topljivi u vodi; procesi uklanjanja vode iz reakcijske smjese vrlo su skupi; u vodi se često odvijaju nepoželjne sporedne reakcije kao što su hidroliza, racemizacija i polimerizacija), proučavaju se alternativna otapala već više od dva desetljeća. Istražuju se alternativna otapala koja bi zadržala tehnološka svojstva organskih otapala, ali s povoljnijim učinkom za ljude i okoliš. Cilj je smanjiti onečišćenje okoliša tako da se zamijene opasna otapala koja se dobivaju iz nafte s otapalima iz obnovljivih izvora uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje. Zbog navedenih se razloga proučavaju druga alternativna otapala poput ionskih kapljevina, prirodnih eutektičkih otapala, superkritičnih i subkritičnih fluida (slika 1) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

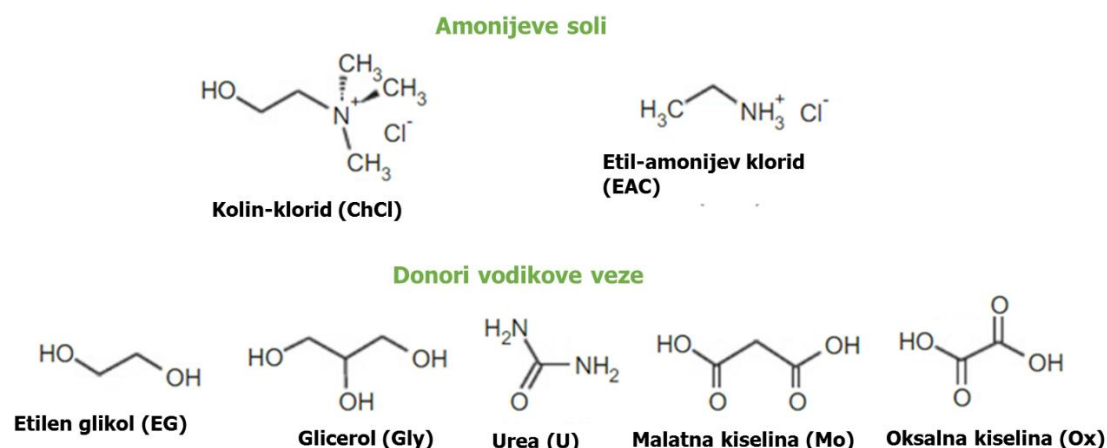


Slika 1. Zastupljenost zelenih otapala u znanstvenoj literaturi (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a)

2.2.1 Prirodna eutektička otapala

Prirodna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*) su nova generacija zelenih otapala. Otapala se posljednjih godina istražuju za moguću primjenu u procesima kao što su ekstrakcija, razdvajanje, pročišćavanje, sušenje produkta, ali i u analitičkim metodama budući da omogućavaju međusobni kontakt komponenata u sustavu. (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a)

Prirodna eutektička otapala nastaju miješanjem nabijenog akceptora vodika s donorom vodika, gdje se navedene komponente povezuju jakim vodikovim vezama. Za pripremu se najčešće kao akceptor vodika koristi organska sol kolin-klorid, a kao donor vodika razni šećeri, amini, amidi, alkoholi, vitamini i organske kiseline (slika 2). Pripremaju se od jeftinih, lako dostupnih, netoksičnih tvari i miješaju se u različitim molarnim omjerima. Fizikalno-kemijska svojstva ovise o strukturi otapala, a broj mogućih kemijskih struktura koje proizlaze iz različitih kombinacija akceptora i donora vodika je velik. Pozitivne karakteristike ovih otapala su niža točka taljenja od pojedine komponente, biorazgradivost i lakša priprema za razliku od ionskih kapljevina. Klasičan primjer je smjesa kolin-klorida (ChCl) ($T_t = 302\text{ }^{\circ}\text{C}$) i uree ($T_t = 133\text{ }^{\circ}\text{C}$) u molarnom omjeru 1:2, temperatura tališta navedenog eutektičkog otapala je $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).



Slika 2. Akceptori (amonijeve soli) i donori vodika koji se najčešće koriste u pripravi eutektičkih otapala (Durand i sur., 2012.)

Danas su eutektička otapala široko priznata kao nova, četvrta generacija ionskih tekućina zbog mnogih zajedničkih fizikalno-kemijskih karakteristika (nehlapljivost, nezapaljivost, velika viskoznost), no ipak treba istaknuti da su to zapravo dvije različite vrste otapala. NADES-ovi se definiraju se kao smjesa dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koje u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Paiva i sur., 2014). S obzirom na kemijsku prirodu komponenata, NADES-ovi su smjese Lewis-ovih ili Brønsted-ovih kiselina i baza, te mogu sadržavati različite anione i katione. Za razliku od njih, ionske kapljevine se formiraju prvenstveno od jedne izolirane vrste kationa i aniona (Smith i sur., 2014).

Mogu se pripremiti na više načina: iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje se zagrijevaju do unaprijed određene vrijednosti temperature (Paiva i sur., 2014). Najčešće se pripremaju postupkom blagog zagrijavanja gdje se točno određena masa komponenata izvaže, te se s ili bez dodatka vode zagrijava uz miješanje na temperaturi do 100 °C, 30 do 90 minuta dok se ne formira bistra tekućina. Molarni omjer komponenata i temperatura taljenja ovisi o kemijskoj prirodi komponenata eutektičnog otapala. Otapala istog kemijskog profila mogu se dobiti vakuum uparavanjem gdje se sastojci NADES prvo otapaju u vodi, a potom uparavaju na 50 °C pomoću rotacijskog uparivača do postizanja konstantne mase (Abbott i sur., 2004; Dai i sur., 2013). Razlog nastajanja tekućih eutektičkih otapala je međusobno povezivanje dviju ili više krutih ili tekućih komponenata pomoću vodikovih veza.

Prva primjena eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida bila je za elektropoliranje metala, elektrotaloženje i procesiranje metala, a danas se koriste u organskoj sintezi,

(bio)katalizi, ekstrakciji, proizvodnji polimera, nanomaterijala, elektrokemiji i procesima separacije (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b). Također, eutektička otapala mogu se primijeniti u ekstrakciji glicerola iz biodizela (Durand i sur., 2013).

Ova se otapala primjenjuju i kao otapala u organskim sintezama i (bio)katalizi zbog mogućnosti prilagodbe njihovih svojstava odabirom početnih sirovina, elektrokemiji, proizvodnji polimera, u procesima separacije i analize te pri ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala (otapaju ih 10 do 100 puta bolje nego voda) (Zhang i sur., 2012). Eutektička su otapala bazirana na spojevima sigurnima za ljudsku konzumaciju stoga se primjenjuju u terapiji kostiju i u raznim drugim područjima unutar biomedicine (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). U biotransformacijama se mogu koristiti kao čista otapala, kootapala u vodenom mediju i kao dio dvofaznog sustava (Faber, 2011).

2.3 Biotransformacije

Zbog negativnog učinka kemijske sinteze na okoliš u današnje vrijeme primjena biotransformacija sve više raste. Biotransformacije podrazumijevaju pretvorbu određenog supstrata u određeni produkt uz pomoć katalizatora biološkog podrijetla. Biotransformacije se u današnje vrijeme koriste za specifične modifikacije strukture supstrata preko selektivnih transformacijskih reakcija, djelomičnu razgradnju supstrata u željeni metabolit pomoću kontroliranih mikrobni reakcija ili reakcijskih puteva te za proširenje strukture supstrata pomoću biosintetskih reakcija u umjetne strukture (Bommarius i Riebel, 2004).

Biokataliza omogućava proizvodnju organskih spojeva koja je ekonomski i ekološki prihvatljiva, primjenu obnovljivih sirovina i obuhvaća načela zelene kemije. Primjenom biokatalize skraćuje se vrijeme procesa, povećava se selektivnost i prinos, potrošnja energije je puno manja zbog smanjene temperature te se ne koristi visoki tlak. Smanjuje se potrošnja metala i organskih otapala što smanjuje nastanak otpada po jedinici produkta (Bommarius i Riebel, 2004).

Početak razvoja biotransformacija počinje još u 19. stoljeću i vezan je za fermentacijske procese, zatim u 20. stoljeću započinje ubrzani razvoj korištenjem mikroorganizama za dobivanje kemijskih spojeva poput šećera i aminokiselina, ali i različitih složenijih kiralnih spojeva s ljekovitim djelovanjem. Ovi stari postupci su se kasnije razvili u tehnološke postupke u industrijskom mjerilu, ali biotransformacije su dobile svoje sadašnje značenje tek otkrićem mikrobni transformacija steroida kao što su redukcija androstendiona u testosteron sa *Saccharomyces cerevisiae*, 11 α -hidroksilacija progesterona s *Rhizopus*

arrhizus ili uvođenje dvostruke veze u 3-okso-4-en-steroida s *Corynebacterium simplex*. Zadnjih dvadeset godina je primjena biotransformacija u industriji značajno porasla zahvaljujući dostupnosti velike količine enzima, razvitku genetičkog inženjerstva te zbog povećane potrebe za enantiomerno čistim spojevima u farmaceutskoj industriji i poljoprivredi (Grogan, 2009a)

Učinkovita primjena biotransformacija u industriji ovisi o dostupnosti i cijeni enzima i mikroorganizama, pripremi hranjivog supstrata ili reakcijske smjese, pripremi biokatalizatora, izdvajanju proizvoda iz biološki promijenjene hranjive podloge ili prirasle biomase, odnosno enzimski promijenjene reakcijske smjese, prednostima nad uspostavljenim kemijskim metodama i procesima, vremenskim zahtjevima, zbrinjavanju nastalog otpada te se krajnja odluka o izboru procesa donosi s obzirom na pripravu traženog proizvoda (Faber, 2011).

Biokataliza se u velikom mjerilu koristi za dobivanje uobičajenih spojeva pa sve do finih kemikalija i skupih farmaceutika. Neki od takvih biotransformacijskih proizvoda koji se proizvode u velikom mjerilu su akrilamid, aspartam, nikotinamid, vitamin C, visoko fruktozni kukuruzni sirup, mlijeko bez laktoze, D-pantotenska kiselina, 6-aminopenicilinska kiselina, L-aspartat, L-alanin, (*S*)-klorpropionska kiselina i L-karnitin (Bommarius i Riebel, 2004; Ghisalba i sur., 2010).

U farmaceutskoj industriji najveća primjena biokatalitičkog procesa je konverzija penicilina G u 6-aminopenicilinsku kiselinu pomoću enzima penicilin-amidaze. Primjena ovog enzimskog postupka omogućuje skraćivanje kemijski kataliziranog procesa sa tri stupnja na samo jedan. Također reakciju je moguće provesti pri blagim reakcijskim uvjetima. (Lancaster, 2002).

Učestalost upotrebe određenih biokatalizatora nije jednolika raspoređena među različitim tipovima biotransformacija koje uključuju reakcije hidrolize, redukcije, oksidacije, oksigenacije, adicije i eliminacije te stvaranje C-C veza (Tablica 1) (Faber, 2011).

Tablica 1. Biokatalizatori u različitim biotransformacijskim reakcijama (Faber, 2011.)

Tip reakcije	Biokatalizatori
Hidroliza	Proteaze, esterase, lipaze
Redoks-reakcije	Dehidrogenaze, oksidaze, oksigenaze
Stvaranje C-C veza	Aldolaze, transketolaze
Adicija i eliminacija	Oksinitrilaza, fumaraza

U biotransformacijama koje obuhvaćaju redoks-reakcije kao biokatalizatori se upotrebljavaju dehidrogenaze, oksigenaze i oksidaze. Tim enzimima su potrebni koenzimi (najčešće NAD(H), NADP(H), FMN, FAD i PQQ) koji daju ili primaju kemijske ekvivalente za redukciju ili oksidaciju. Koenzimi su relativno skupi i nestabilni za upotrebu, no ne mogu se zamijeniti ekonomičnijim sintetskim produktima te ih je potrebno regenerirati. Dehidrogenaze su u širokoj upotrebi za redukciju karbonilne skupine aldehida i ketona te ugljik-ugljik dvostruke veze, dok se oksigenaze upotrebljavaju u oksidacijskim reakcijama katalizirajući funkcionalizaciju neaktiviranih C-H i C=C veza, a oksidaze sudjeluju u prijenosu elektrona (Bommarius i Riebel, 2004).

2.3.1 Biokatalizatori u biotransformacijama

U biotransformacijama se kao biokatalizatori koriste enzimi (sirovi ili pročišćeni), biljne i životinjske stanice i tkiva, čiste kulture mikroorganizama (bakterije, kvasci, plijesni, alge) te umjetni enzimi (abzimi) (Grogan, 2009a) koji imaju središnju ulogu između interdisciplinarnih znanosti i industrije (Bommarius i Riebel, 2004).

Njihova je prednost što se mogu dobiti iz obnovljivih izvora, biorazgradivi su te se mogu koristiti u vodenom mediju (Grogan, 2009b). Korištenje biokatalizatora u procesima ekološki je prihvatljivo zbog blagih uvjeta reakcija (prihvatljiv raspon pH od 4 do 9, temperatura od 10 °C do 50 °C i normalan tlak) koje bi inače zahtijevale izrazito kisele ili lužnate uvjete (Holland, 2002). Također, važna prednost enzima je njihova kemo-, regio- i enantiomerna selektivnost, što omogućava lakše odvajanje produkata, minimalno odvijanje sporednih reakcija bez potrebe za primjenom protekcijskih skupina (Bommarius i Riebel, 2004). Ta specifična svojstva biokatalizatora posebno se primjenjuju u području biotransformacija.

Svaki katalizator, a time i svaki biokatalizator, može se okarakterizirati sa tri osnovne veličine: aktivnost, selektivnost i stabilnost (Bommarius i Riebel, 2004).

Biokatalizatori često imaju mnogo bolju selektivnost od nebioloških katalizatora, bilo da je u pitanju enantio-, kemo- ili regioselektivnost. Zahvaljujući važnosti enantiomerne čistoće ciljanog proizvoda, enantioselektivnost je najvažnija vrsta selektivnosti u biokatalizi. Ona se kontrolira enantiomernim viškom (ee), koji obuhvaća ukupnu selektivnost do točke izolacije proizvoda, te enantiomernim odnosom ili E vrijednošću, koja označava enantioselektivnost u određenom stupnju konverzije (Bommarius i Riebel, 2004).

Aktivnost enzima jednostavna je za mjerenje i nužna čak i u osnovnim eksperimentalnim protokolima. U usporedbi s drugim katalizatorima, većina enzima je aktivna

i stabilna pri određenoj temperaturi i pH području (uglavnom između 15 °C i 50 °C te pH 5 i 10). Ukupna aktivnost enzima izražava se u internacionalnim jedinicama, ali aktivnost enzima može se izraziti i kao specifična aktivnost, svedena na masu katalizatora, te volumetrijska aktivnost koja se temelji na aktivnosti katalizatora po jedinici volumena:

$$\text{ukupna aktivnost} = 1 \text{ I.J.} = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$\text{specifična aktivnost} = 1 \text{ I.J.}/\text{mg enzima} = 1 \mu\text{mol}/(\text{min mg enzima})$$

$$\text{volumetrijska aktivnost} = 1 \text{ I.J.}/\text{ml} = 1 \text{ mol}/(\text{min ml})$$

Aktivnost katalizatora je valjani parametar tijekom procesa samo ako se navedu specifikacije uvjeta mjerenja iste. Za povećanje volumetrijske aktivnosti katalizatora potrebno je dodati više katalizatora u sustav dok se specifična aktivnost poboljšava optimiranjem reakcijskih uvjeta (Bommarius i Riebel, 2004).

Za razliku od aktivnosti, stabilnost enzima se tumači kao toplinska stabilnost, tj. temperatura iznad koje enzim gubi stabilnost. Iako je ta vrijednost važna, svaka stabilnost na određenoj temperaturi ovisi o vremenu izlaganja pa je često takva konstatacija nejasna. Zbog toga je za biokatalitičke procese važnija stabilnost rada, koja označava dugotrajnu stabilnost u određenim uvjetima (Bommarius i Riebel, 2004).

Primjene čistih, izoliranih enzima kao biokatalizatora provode se u blagim reakcijskim uvjetima čime se smanjuju problemi s neželjenim nusreakcijama koje često prate konvencionalne kemijske metode (npr. razgradnja, izomerizacija, racemizacija i pregradnja). Nedostaci njihove primjene su ograničena stabilnost enzima, potreba za kofaktorima te cijena izolacije enzima (Grogan, 2009a). Bez obzira u kojem obliku, postoji niz prednosti korištenja cijelih stanica kao biokatalizatora (četiri glavna oblika: kulture u fazi rasta, fazi mirovanja, u obliku pora i imobilizirane kulture) u biotransformacijama. Provođenje reakcija s cijelim stanicama kao biokatalizatorima je jeftina i jednostavna tehnika kao i izdvajanje biokatalizatora iz reakcijske smjese. Reakcije se odvijaju u vodenom mediju i nema potrebe za korištenjem enzimskih kofaktora (skupi i krhki) jer se isti većinom proizvode i recikliraju u samoj stanici. Imobilizirane kulture se primjenjuju kod potrebe aktivnosti biokatalizatora kroz dulji vremenski period, te njihove ponovne upotrebe. Još jedna od prednosti upotrebe imobiliziranih stanica je i lako uklanjanje i pročišćavanje produkta iz reakcijske smjese. Nedostatak upotrebe imobiliziranih kultura je smanjenje katalitičke aktivnosti enzima zbog ograničenja difuzije supstrata/produkta, a taj se nedostatak nastoji izbjeći povećanjem gustoće imobiliziranih stanica (Faber, 2011).

Biljne i životinjske stanice se upotrebljavaju u manjoj mjeri od mikroorganizama jer rastu sporije. Mikroorganizmi imaju brži stanični metabolizam pa brže provode biotransformacije te mogu transformirati širok spektar supstrata. Također su manje osjetljivi na uvjete različitih tehnika kultiviranja od biljnih i životinjskih stanica (Bommarius i Riebel, 2004).

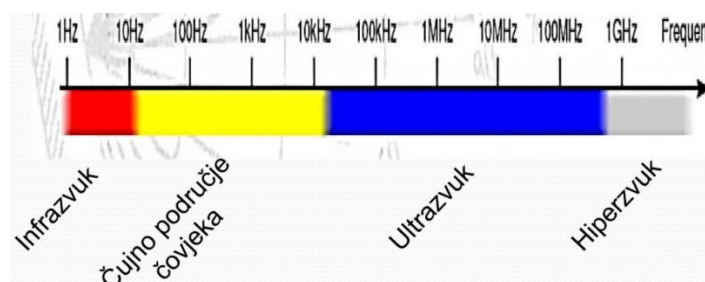
2.3.1.1 Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizator

Jedan od najčešće upotrebljivanih mikroorganizama u redukcijama jest pekarski kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, koji se koristi u mnogim reakcijama biotransformacija kada su potrebni stereoselektivni katalizatori za dobivanje kiralnih intermedijara. *Saccharomyces cerevisiae* je jeftin i nepatogen kvasac koji se lako uzgaja, a liofiliziran se može jako dugo čuvati. Zahvaljujući brojnim enzimima može reducirati male alifatske i aromatske ketone prema Prelogovom pravilu što rezultira najčešće *S*-alkoholom (Glieder, 2008). Njegova je upotreba bila uglavnom ograničena na vodene medije u kojima se nisu mogle postići zadovoljavajuće brzine reakcija i prinosi pa se pokušalo s ionskim tekućinama. Takav pristup je objedinio prednosti cijelih stanica kao biokatalizatora i ionskih tekućina koje se mogu reciklirati uz zadovoljavajuće rezultate. U nekim ionskim tekućinama moguće je uz upotrebu visokog vakuuma provesti direktnu destilaciju dobivenog alkohola iz smjese (Dai, 2001). Kvasci se mogu i imobilizirati i na taj način višestruko koristiti i olakšati izolaciju proizvoda, ali tada katalitička aktivnost kvasca opada te može doći i do promjena u stereoselektivnosti. Negativne strane upotrebe živih mikroorganizama kao biokatalizatora su nakupljanje metabolita što otežava pročišćavanje, optička čistoća produkta ovisi o starosti kvasca, u velikim mjerilima potrebno je dodati glukozu za regeneraciju kofaktora te je zbog toksičnosti supstrata potrebno raditi u razrijeđenim sustavima (Veschambre, 1995; Glieder, 2008).

2.3.2 Primjena ultrazvuka u biotransformacijama

Ultrazvučni val je gibanje mehaničkog poremećaja kroz sredstvo, a u praktičnoj primjeni ga susrećemo u obliku impulsa ili harmonijskog vala (Brnčić i sur., 2009a). Ultrazvučni valovi su slični zvučnim valovima, ali imaju frekvencije više od 16 kHz (slika 3), pa ih ljudsko uho ne može čuti. Učinak ultrazvuka je puno korisniji pri nižim frekvencijama (18–40 kHz), dok je zanemariv u rasponu od 400–800 kHz, jer kod nižih frekvencija dominiraju mehanički učinci fenomena kavitacije (Drmić i Režek-Jambrak, 2010). Do nastanka kavitacije doći će prilikom obrade materijala ultrazvukom, kada zvučni val dođe do tekuće sredine te nastaju longitudinalni valovi pri čemu dolazi do naizmjeničnih ciklusa sažimanja i ekspanzije. Tada se formiraju mjehurići plina u materijalu (Bates i Patist, 2008). Kavitacije mogu biti stabilne, te

tada dolazi do sudaranja kavitacijskih mjehurića i prijelazne kada mjehurići implodiraju te tako prenose energiju u okolni medij. Kada mjehurić dosegne maksimalnu veličinu te kada procesi koji se događaju unutar kavitacijskog mjehurića postanu kritični, dolazi do kolapsa mjehurića i širenja energije. Pucanje kavitacijskih mjehurića uzrokuju vrlo visoke temperature i tlakovi u mediju. Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitacije ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji, amplitudi), okolnim uvjetima (temperaturi, tlaku i vlažnosti) te svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti) (Brnčić i sur., 2009b).



Slika 3. Područje ultrazvuka (Anonymus, 2018.)

U sintetskim reakcijama i biotehnološkim postupcima, predtretman ultrazvukom povećava iskorištenje reakcije svojim mehaničkim djelovanjem na uzorak. Primjerice, ultrazvučni val uzrokuje pucanje staničnih stijenki kvašćevih stanica te dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice. Poboljšana metabolička produktivnost mikroorganizama, životinjskih i biljnih stanica može uvelike poboljšati ekonomičnost biotehnološkog procesa, a može se postići tretmanom ultrazvukom. Ultrazvuk se općenito povezuje sa oštećenjem stanica, ali postoji i pozitivan utjecaj kontroliranog ultrazvuka na konverzije katalizirane živim stanicama. Pri dovoljno visokoj frekvenciji, ultrazvuk razbija stanice i dovodi do ispuštanja unutarstaničnih enzima. Jako snažan ultrazvuk može oštetiti enzime, to se dogodi najvjerojatnije zbog odmatanja nativnog proteina i razbijanja lanca u manje peptide. (Chisti, 2003).

Ultrazvuk značajno utječe na brzinu različitih procesa u bioprocesnom inženjerstvu i industriji hrane. Koristeći ultrazvuk, puno reakcija može biti provedeno u nekoliko minuta s visokom ponovljivosti, smanjujući potrošnju otpala, pojednostavljujući rukovanje i obradu, dajući veću čistoću konačnog produkta, eliminirajući naknadnu obradu otpadnih voda i konzumiranje samo dijela otpala koji su potrebni za konvencionalne metode (Chemat i sur., 2010).

Stanice se mogu značajno razlikovati po svojoj osjetljivosti na ultrazvuk. Primjerice izloženost tretmanu ultrazvuka 5 minuta (20 kHz, 50 W) povećava brzinu rasta i konačni prinos

biomase cijanobakterije *Anabaena flosaquae*. Dok isti tretman smanjuje brzinu rasta mikroalge *Selenastrum capricornutum*. Kod obje vrste je ultrazvučni tretman povećao sadržaj proteina u stanicama. Ovi učinci sugeriraju da samo kratki periodi tretmana ultrazvukom na žive stanice imaju potencijal za poboljšanje bioprocesa. (Chisti, 2003).

Kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, za vrijeme proizvodnje etanola isprekidani tretman ultrazvukom od 300 W m⁻³ i 25 kHz je udvostručio iskorištenje proizvodnje etanola. Međutim, prilikom kontinuiranog tretmana nije došlo do ovog pozitivnog utjecaja. Ali, prilikom kontinuiranog tretmana niske snage (300 W m⁻², 43 kHz) smanjeno je vrijeme fermentacije za 50 % do 64 % ovisno o upotrijebljenom soju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u proizvodnji piva i vina. (Chisti, 2003). Ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno jeftine. Elementi pretvornika su smješteni na dnu spremnika i glavna ultrazvučnih kupelji radi na frekvenciji od 20-40 kHz, iako postoje izvedbe i u višem frekvencijskom području (Brnčić i sur. 2009c).

3. Eksperimentalni dio

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

- Destilirana voda
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilen glikol, puriss. p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *n*-Heptan, Acros Organics, New Jersey, USA
- 1-(3,4-dimetilfenil)etanon, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.2 Biokatalizator

- Instant suhi pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, Kvasac d.o.o., Hrvatska

3.1.3 Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Homogenizator/inkubator ES-20/60, Biosan, Latvija
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Rotacioni vakuum uparivač, DEVAROT Slovenija, Buchi R-124, Švicarska
- Tikvice s okruglim dnom, Deotto Lab, Hrvatska
- Ultrazvučna kupelj GRANT XUB5, Grant Instruments, Engleska, Ujedinjeno kraljevstvo

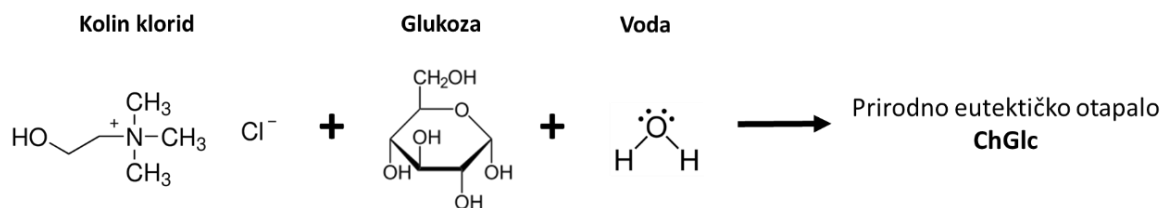
3.2 Metode rada

3.2.1 Priprema prirodnih eutektičkih otapala

a) Priprema prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza (ChGlc)

U tikvici s okruglim dnom pomiješaju se kolin-klorid i glukoza u molarnom omjeru 1:1 uz dodatak 30 %, 50 % ili 80 % vode (v/v). Mase potrebnih metabolita prikazane su u tablici 2.

Priprema se odvijala uz zagrijavanje pri 50 °C na magnetskoj miješalici tijekom 2 sata (slika 4.). Dobiveno prirodno eutektičko otapalo je prozirna, homogena i bezbojna tekućina.



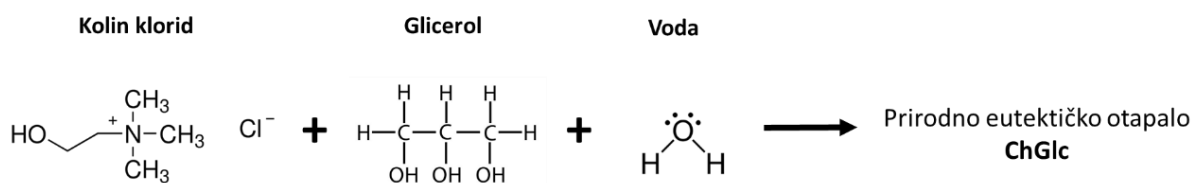
Slika 4. Shema pripreme prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza

Tablica 2. Mase metabolita za pripremu prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza

Puni naziv NADES	Kratika	Udio vode [% , v/v]	m (kolin- klorid) [g]	m (glukoza) [g]	m (voda) [g]
Kolin-klorid:glukoza s 30% vode	ChGlc30	30	9,8	12,65	9,62
Kolin-klorid:glukoza s 50% vode	ChGlc50	50	7,0	9,03	16,03
Kolin-klorid:glukoza s 80% vode	ChGlc80	80	2,8	3,61	25,65

b) Priprema prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol (ChGly)

U tikvici s okruglim dnom pomiješaju se kolin-klorid i glicerol u molarnom omjeru 1:2 uz dodatak 30 %, 50 % ili 80 % vode (v/v). Mase potrebnih metabolita prikazane su u tablici 3. Priprema se odvijala uz zagrijavanje na 50 °C na magnetskoj miješalici tijekom 2 sata (slika 5). Dobiveno prirodno eutektičko otapalo je prozirna, homogena i bezbojna tekućina.



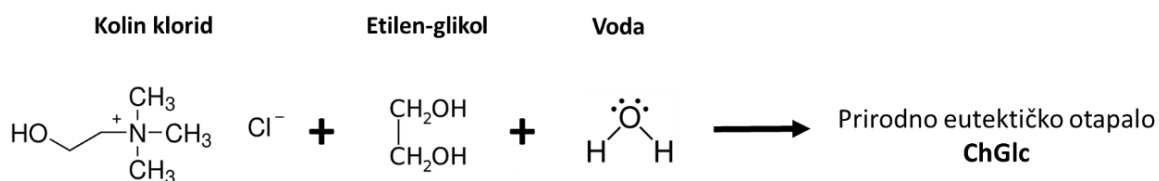
Slika 5. Shema pripreme prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol.

Tablica 3. Mase metabolita za pripremu prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol

Puni naziv NADES	Kratica	Udio vode [%, v/v]	m (kolin-klorid) [g]	m (glicerol) [g]	m (voda) [g]
Kolin-klorid: glicerol s 30% vode	ChGly30	30	9,1	11,96	9,03
Kolin-klorid: glicerol s 50% vode	ChGly50	50	7	9,2	16,2
Kolin-klorid: glicerol s 80% vode	ChGly80	80	2,8	3,68	25,92

c) Priprema prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol (ChEG)

U tikvici s okruglim dnom pomiješaju se kolin-klorid i etilen-glikol u molarnom omjeru 1:2 uz dodatak 30 %, 50 % ili 80 % vode (v/v). Mase potrebnih metabolita prikazane su u tablici 4. Priprema se odvijala uz zagrijavanje na 50 °C na magnetskoj miješalici tijekom 2 sata (slika 6). Dobiveno prirodno eutektičko otapalo je prozirna, homogena i bezbojna tekućina.



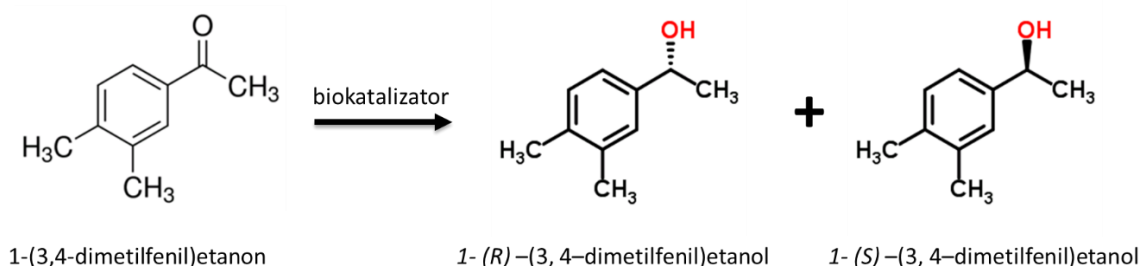
Slika 6. Shema pripreme prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen glikol

Tablica 4. Mase metabolita za pripremu prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen glikol

Puni naziv NADES	Kratica	Udio vode [%, v/v]	m (kolin-klorid) [g]	m (etilen-glikol) [g]	m (voda) [g]
Kolin-klorid: etilen-glikol s 30% vode	ChEG30	30	11,2	9,92	9,05
Kolin-klorid: etilen-glikol s 50% vode	ChEG50	50	7,7	6,82	14,52
Kolin-klorid: etilen-glikol s 80% vode	ChEG80	80	3,5	3,1	26,4

3.2.2 Enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirana pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

Enantioselektivna redukcija je provedena pomoću pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatora u pripremljenim prirodnih eutektičkim otapalima, kao i u vodi. Prirodna eutektička otapala u kojima je reakcija provedena su: ChGlc30, ChGlc50, ChGlc80, ChGly30, ChGly50, ChGly80, ChEG30, ChEG50, ChEG80. Asimetričnom redukcijom aromatskog ketona nastaje kiralni alkohol što je vidljivo na slici 7.



Slika 7. Redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u 1-(*R*, *S*)-(3, 4-dimetilfenil)etanol

Najprije se stanice kvasca isperu s destiliranom vodom. Instant suhi kvasac pomiješa se s destiliranom vodom (5 g mL⁻¹), miješa se na homogenizatoru dok se ne dobije homogena smjesa. Dobivena suspenzija se centrifugira na 6 000 min⁻¹ tijekom 20 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant se odlije, a talog (kvašćeva biomasa) se koristi dalje za asimetričnu redukciju 1-(3,4-dimetilfenil)etanona prema slijedećem protokolu: u epruvetu od 15 mL se doda 0,04 g glukoze, 1 g kvasca, 2 ml prirodnog eutektičnog otapala (ChGlc30, ChGlc50, ChGlc80, ChGly30, ChGly50, ChGly80, ChEG30, ChEG50, ChEG80) ili destilirane vode (pH-vrijednost = 7) i 0,168 mM supstrata (1-(3,4-dimetilfenil)etanon). Sve se homogenizira na homogenizatoru te se uzorci stavljaju na tresilicu termostatiranu na 30 °C tijekom 24 sata.

Nakon 24 sata reakcijska smjesa se centrifugira na 6 000 min⁻¹ tijekom 20 minuta kako bi se uklonio kvasac, a supernatant se odlije u nove epruvete. Profiltrirani supernatant ekstrahira se s *n*-heptanom (3 x 3 mL) uz snažno miješanje na vrtložnoj miješalici tijekom 10 minuta. Heptanski sloj u kojem se nalazi produkt i zaostali supstrat se zatim upari do suha na rotacionom vakuum uparivaču i resuspendira u 50 µL *n*-heptana te se analizira plinskom kromatografijom. Tijek radnji vidljiv je na slici 8.



Slika 8. Pojednostavljena shema redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona i detekcije produkta

Kako bi se međusobno usporedila uspješnost redukcije u različitim otapalima, za reakciju u pojedinom otapalu izračuna se konverzija i enantiomerni višak.

Iskorištenje procesa redukcije η (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$\eta = \frac{c_A}{c_{AT}} \times 100$$

gdje c_A predstavlja izmjerenu koncentraciju alkohola (mol L⁻¹), a c_{AT} teoretski moguću koncentraciju alkohola (mol L⁻¹).

Enantiomerni višak ee (%) se izračuna prema jednadžbi:

$$ee = \frac{(R_{(3,4dimetilfenil)etanol} - S_{(3,4dimetilfenil)etanol})}{(R_{(3,4dimetilfenil)etanol} + S_{(3,4dimetilfenil)etanol})} \times 100$$

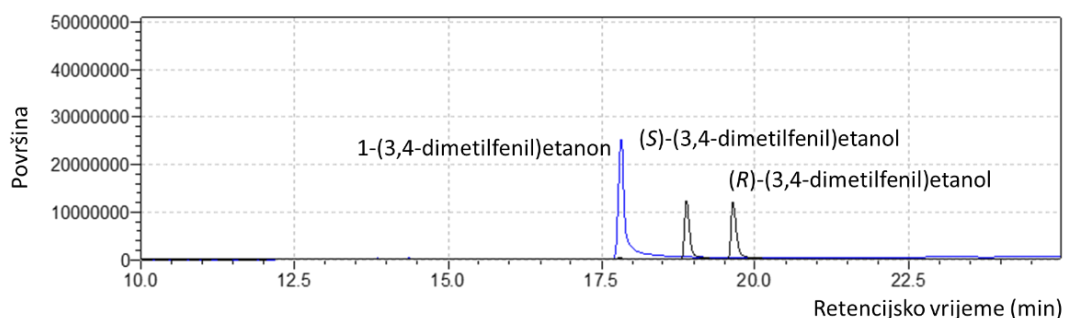
gdje $R_{(3,4dimetilfenil)etanol}$ predstavlja površinu ispod pika 1-(*R*)-(3,4-dimetilfenil)etanola, a $S_{(3,4dimetilfenil)etanol}$ površinu ispod pika 1-(*S*)-(3,4-dimetilfenil)etanola.

3.2.2.1 Određivanje koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona

Kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom na uređaju Shimadzu QP2010PLUS.

Kromatografski uvjeti za određivanje supstrata:

- Kromatografska kolona: kapilarna kiralna kolona β DEX 225 (39m x 0,25mm x 0,25 μ m)
- Pokretna faza: He
- Protok: 6,7 ml min⁻¹
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura kolone: $T_1=105^\circ\text{C}$ (1 min), $T_2=105^\circ\text{C} - 155^\circ\text{C}$ ($\Delta t=2$ min)
- Vrijeme trajanja analize: 26 min



Slika 9. Tipičan GC kromatogram analize reakcijske smjese enantioselektivne redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona

Identifikacija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona, 1-(*R*)-(3,4-dimetilfenil)etanol i 1-(*S*)-(3,4-dimetilfenil)etanol provedena je na temelju vremena izlaženja razdvojenih pikova u reakcijskoj smjesi s kiralne kromatografske kolone te je potvrđena usporedbom masenih spektara u bazi podataka (slika 9). Retencijsko vrijeme (R_t) za 1-(3,4-dimetilfenil)etanona iznosi 18 min, R_t za 1-(*R*)-(3,4-dimetilfenil)etanol 19,75 min i R_t za 1-(*S*)-(3,4-dimetilfenil)etanol 19 min.

3.2.2.2 Izrada baždarnog dijagrama

Pripreme se otopine 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,15; 0,075; 0,0375; 0,01875; 0,009375 mmol L⁻³. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanese se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrtava dijagram ovisnosti množinske koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona o površini ispod pika te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u uzorcima.

Molarna koncentracija supstrata računa se izravno prema jednadžbi pravca dobivene iz baždarnog dijagrama.

3.2.3. Predtretman pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ultrazvukom u najpogodnijem prirodnom eutektičkom otapalu

Najprije se stanica kvasca isperu s destiliranom vodom, kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. te se nakon toga u epruvetu doda 0,04 g glukoze i 2 ml prirodnog eutektičnog otapala ChGly30 ili vode. Potom se doda 1 g pripremljenog kvasca. Takav se sastav tikvice podvrgava

predtretmanu u ultrazvučnoj kupelji GRANT XUB5 30, 60 ili 120 minuta na 30°C, pri snazi ultrazvučnog zračenja 250 W.

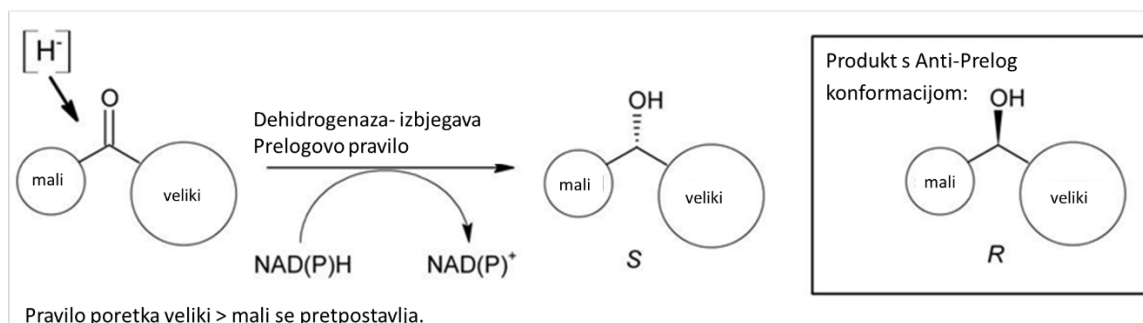
Nakon predtretmana ultrazvukom u reakcijsku smjesu se dodaje 0,168 mM supstrata (1-(3,4-dimetilfenil)etanona) čime započinje reakcija redukcije. Epruvete se potom stavljaju na termostatiranu tresilicu na 30°C te se nakon 24 h analizira reakcijska smjesa iz koje se produkt i zaostali supstrat ekstrahiraju s *n*-heptanom, uz snažno miješanje na vrtložnoj miješalici kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. te se zatim heptanski ekstrakt analizira plinskom kromatografijom.

4. Rezultati i rasprava

Koncept kiralnosti, nemogućnost preklapanja molekule i njene zrcalne slike zbog prostornog rasporeda atoma, određuje funkcionalnost i biološku aktivnost molekule. Kiralnost određuje kako će stereoisomeri reagirati u biološkom sustavu. Zbog toga je potrebno koristiti enantiomerno čisti oblik aktivnog spoja (Ai Nguyen i sur., 2006). Dva enantiomerna oblika, *R* i *S*, imaju različite strukturne karakteristike te zbog toga mogu imati i različite biološke aktivnosti (Liang i sur., 2015).

Čisti enantiomerni pripravci kiralnih alkohola važni su prekursori u reakcijama sinteze farmaceutskih spojeva, pesticida, feromona i drugih spojeva. Sintaza kiralnih spojeva, kao što su optički aktivni alkoholi i amini, predstavlja izazov za organsku sintetsku kemiju i postaje njezin važan dio. Enantiomerno čisti ljekoviti pripravci obično se sintetiziraju iz kiralnih građevnih jedinica koje se dobivaju kemijskom katalizom ili biokatalizom.

U klasičnoj organskoj sintezi kao katalizatori se rabe metalni hidridi, a kao produkt se dobiva racemična smjesa. Uvođenjem biokatalizatora (izolirani enzimi, mikroorganizmi, biljna i životinjska tkiva odnosno stanice) omogućava se dobivanje pripadajućih alkohola visoke optičke čistoće, a istovremeno se reakcije provode pri blagim uvjetima. Ovakav pristup je posebno pogodan za sintezu osjetljivih proizvoda te je značajan sa aspekta očuvanja okoliša (u skladu sa principima zelene kemije). Vladimir Prelog, jedan je od prvih kemičara koji se bavio asimetričnim redukcijama. Njegovo pravilo redukcije kaže da se hidridni ion nastoji vezati na ugljikov atom s *re*-strane prokiralnog ketona i na taj način dati *S*-alkohol (Prelogov produkt) (slika 10). Korištenje ovog pravila omogućuje predviđanje rezultata stereokemijske reakcije i u slučaju korištenja biokatalizatora (Glieder, 2008; Fruchey, 2011). Biokataliza, koja može uključivati izolirane oksido-reducirajuće enzime i žive organizme ili stanice, je novija metoda asimetrične redukcije koja ima mnoge prednosti pred tradicionalnim redukcijama.



Slika 10. Asimetrična redukcija ketona prema Prelogovom pravilu (Glieder, 2008.)

S druge strane, sve više se istražuje primjena zelenih otapala, zbog svojstva poput nehlapljivosti, nezapaljivosti, niske toksičnosti i biorazgradljivosti, a posljednjih se godina kao nova zelena otapala razmatraju prirodna eutektična otapala. .

Stoga, cilju ovog rada je pronalazak najpogodnijeg prirodnog eutektičkog otapala i za sintezu 1-(*S*)-(3,4-dimetilfenil)etanola asimetričnom redukcijom 1-(3,4-dimetilfenil)etanona s pekarskim kvascem te optimizacija reakcije predtretmanom biokatalizatora ultrazvukom. U ovom radu su kao otapala ispitana prirodna eutektička otapala kolin-klorid:glicerol, kolin-klorid:glukoza i kolin-klorid:etilen-glikol s različitim udjelima vode. Kako bi se uspješnost enantioselektivne redukcije u prirodnim eutektičkim otapalima usporedila s konvencionalnim otapalima, reakcija je provedena i u vodi.

4.1 Priprava prirodnih eutektičkih otapala

Priprava prirodnih eutektičkih otapala provodila se je jednostavnim postupkom u kojem se polazne komponente kolin-klorid i glicerol ili glukoza ili etilen-glikol pomiješane u molarnom omjeru 1:2 za glicerol i etilen-glikol te 1:1 za glukozu. Zatim su lagano zagrijavane uz miješanje dok se ne dobije homogena viskozna kapljevina. Iskorištenje ovih reakcija je 100 %, što je značajna prednost kod sinteze prirodnih eutektičkih otapala.

4.2 Enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirana pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

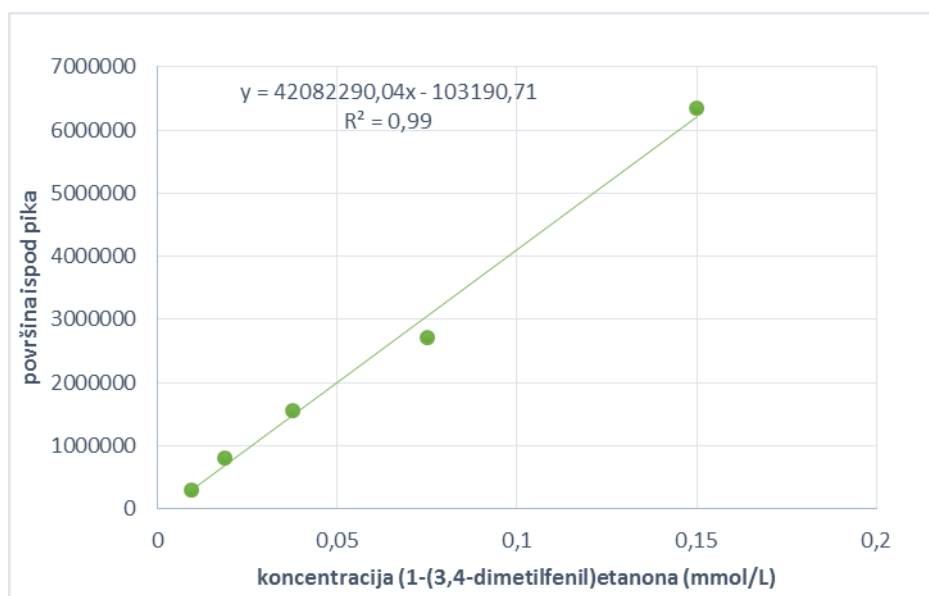
Pekarski kvasac je najčešće korišten mikroorganizam za asimetričnu redukciju ketona, ponajviše jer je dostupan po pristupačnoj cijeni. U ovom radu, pekarski kvasac je korišten kao biokatalizator za redukciju 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u svrhu dobivanja 1-(*S*)-(3,4-dimetilfenil)etanola u prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida. Sintetizirano je 9 različitih prirodnih eutektičkih otapala kako bi se probalo najučinkovitije otapalo za sintezu industrijski važnog kiralnog građevnog bloka i time optimirao reakcijski medij (Johannes i sur., 2006) za najučinkovitiju aktivnost biokatalizatora i sintezu željenog spoja. Ukratko, reakcija započinje dodavanjem supstrata u smjesu prirodnog eutektičkog otapala ili vode (kako bi se usporedila uspješnost redukcije zelenog i konvencionalnog otapala), kvašćevih stanica i glukoze se reakcija provodi tijekom 24 sata na temperaturi od 30°C.

Reakcijska smjesa je analizirana pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom te je koncentracija zaostalog supstrata analizirana prema jednadžbi pravca dobivene iz baždarnog dijagrama (slika 10).

Podaci dobiveni za izradu baždarnog dijagrama nalaze se u tablici 5. Izmjerene površine ispod kromatografskog pika za određene množinske koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona. Grafički se nacrtava baždarni dijagram, pri čemu se na ordinatu stavlja površina ispod pika, a na apsiscu množinska koncentracija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona. Koncentracija u uzorku se određuje iz jednadžbe baždarnog pravca (slika 10).

Tablica 5. Izmjerena površina ispod pika za pripadajuću množinsku koncentraciju 1-(3,4-dimetilfenil)etanona

c (mM)	A
0,15	6 341 401
0,075	2 721 361
0,0375	1 548 405
0,01875	802 940
0,009375	300 105

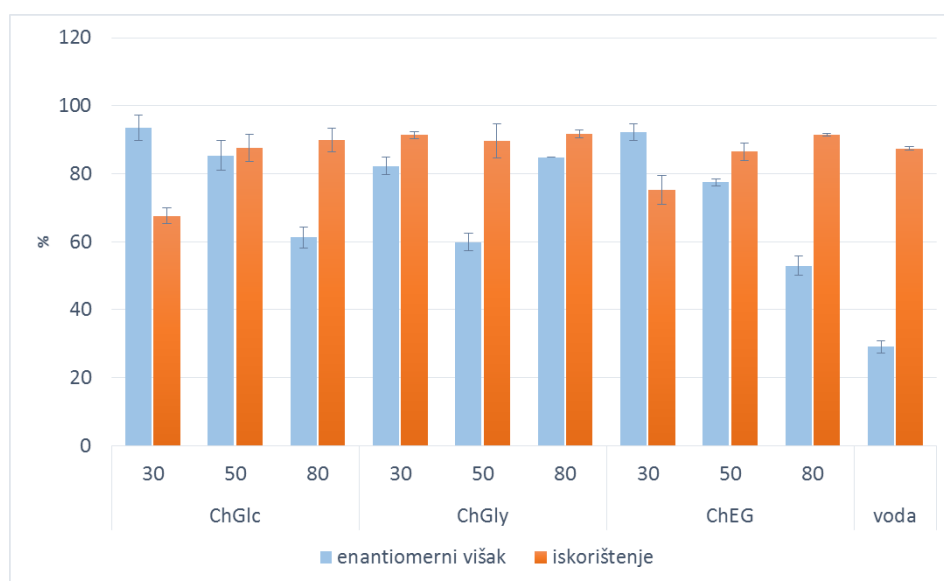


Slika 10. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona

Kako bi se interpretirali rezultati redukcije katalizirane cijelim stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prema jednadžbama navedenim u poglavlju 3.2.2. izračunat je enantiomerni višak i iskorištenje reakcije redukcije, a rezultati su prikazani i grafički na slici 11.

Za sva ispitana prirodna eutektička otapala je iskorištenje 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u 1-(S)-(3,4-dimetilfenil)etanol je bilo između 86,44 % i 91,77 % (osim za ChGlc30 i ChEG30 kada su vrijednosti bile nešto niže, 67,63 % i 75,14 %), jednako visoko kao i u reakciji

provedenoj u vodi 87,40 % (slika 11). Enantiomerni višak je u korelaciji sa strukturom prirodnog eutektičkog otapala, kao i sa udjelom vode u otapalu, a kreće se u rasponu od 52,87 % do 93,44 % (većinom iznad 80%) pri čemu je (*S*)-konfiguracija alkohola dominantna te reakcija slijedi Prelogovo pravilo (Prelog, 1964). Enantiomerni višak za redukciju provedenu u vodi je puno niži, samo 29,07 % stoga se reakcija provedena u prirodnim eutektičkim otapalima pokazala boljom u odnosu na reakciju u vodi. Povećanjem udjela vode u prirodnim eutektičkim otapalima povećava se iskorištenje reakcije, a enantiomerni višak se smanjuje (slika 11).



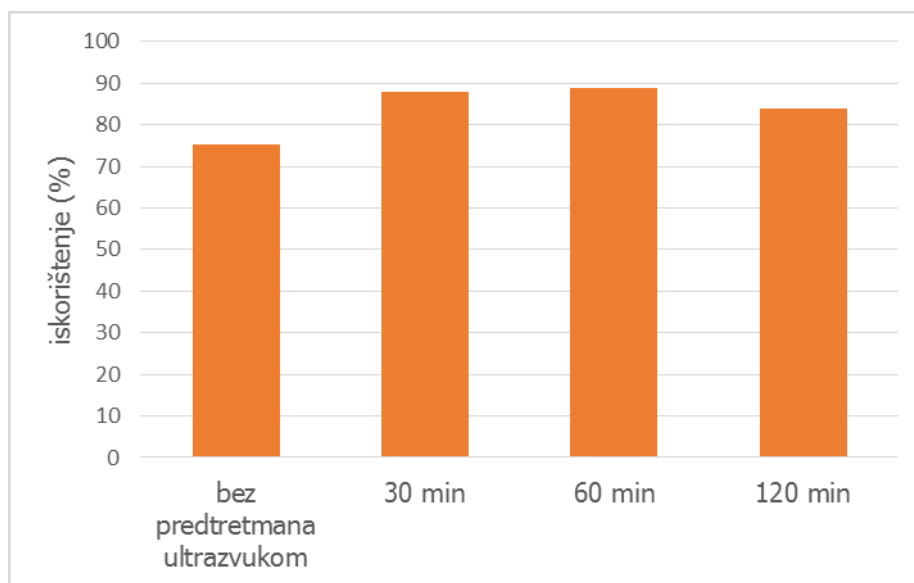
Slika 11. Enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona sa pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatorom u prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida koja sadrže 30 - 80% vode (v/v) i u vodi. Reakcijski uvjeti: 0,168 mmol L⁻¹ 1-(3,4-dimetilfenil)etanona, 1 g pekarskog kvasca, 24 h, 30°C. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti ± S.D. (n = 3).

Kao najpogodnije otapalo za enantioselektivnu redukciju odabrano je kolin-klorid:glicerol s 30 % (v/v) vode zbog najveće selektivnosti biokatalizatora dok se iskorištenje reakcije u nastavku rada nastojalo poboljšati predtretmanom biokatalizatora ultrazvukom.

4.3 Predtretman ultrazvukom i enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirana pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

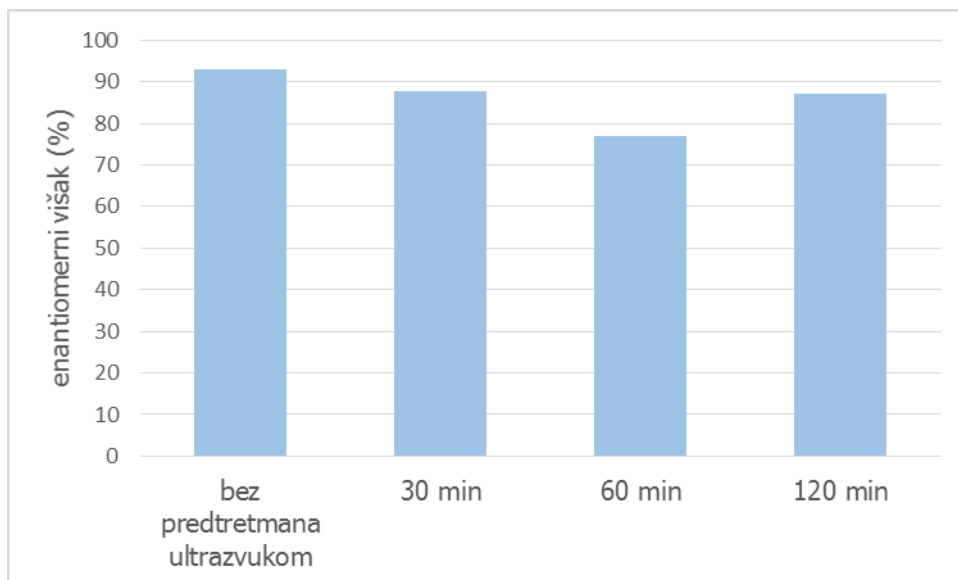
Za poboljšanje biokatalitičke efikasnosti postoji nekoliko mogućnosti u literaturi, uključujući ultrazvučni tretman biokatalizatora (Guerrero i sur., 2005; Liu i sur., 2016; Mortazavi i sur., 2008). S ciljem analize utjecaja ultrazvučnog tretmana pekarskog kvasca, kvasac je tretiran 30, 60 i 120 min (pri 30°C, 250 W) te je onda provedena asimetrična redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u prirodnom eutektičkom otapalu ChGly koje sadrži 30% (v/v) vode.

Nakon predtretmana kvašćevih stanica ultrazvukom, u reakcijsku smjesu je dodan supstrat (0,168 mM) te je reakcija vođena 24 sata i analizirana plinskom kromatografijom s masenom spektroskopijom. Rezultati su prikazani na slici 12 i slici 13. Slika 12 prikazuje konverziju 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u 1-(S)-(3,4-dimetilfenil)etanol koja je veća u odnosu na reakciju vođenu samo bez predtretmana što znači da je predtretman ultrazvukom imao pozitivan utjecaj na reakciju, a najoptimalnijim se je pokazao predtretman u trajanju od 30 minuta.



Slika 12. Grafički prikaz iskorištenja enantioselektivne redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona s predtretmanom ultrazvukom u trajanju od 0, 30, 60 i 120 minuta sa pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatorom u prirodnom eutektičkom otapalu ChGly30. Reakcijski uvjeti: 0,168 mmol L⁻¹ 1-(3,4-dimetilfenil)etanona, 1 g pekarskog kvasca, 24 h, 30°C. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti ± S.D. (n = 3).

Slika 13 prikazuje odnos enantiomernog viška te je za većinu reakcija je oko 80%. Za predtretirane uzorke vidljive su veće vrijednosti enantiomernog viška, što nam govori da ultrazvuk pozitivno djeluje i na enantiomerni višak kao parametar reakcije. Najveći enantiomerni višak pokazuje uzorak koji je 30 minuta predtretiran ultrazvukom.



Slika 13. Grafički prikaz enantiomernog viška enantioselektivne redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona s predtretmanom ultrazvukom u trajanju od 0, 30, 60 i 120 minuta sa pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatorom u prirodnom eutektičkom otapalu ChGly30. Reakcijski uvjeti: 0,168 mmol L⁻¹ 1-(3,4-dimetilfenil)etanona, 1 g pekarskog kvasca, 24 h, 30°C. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti ± S.D. (n = 3).

Kao što se može primijetiti, predtretman ultrazvukom pozitivno utječe na iskorištenje (slika 12). Najveće vrijednosti enantiomernog viška i iskorištenja su vidljive kod uzorka koji je tretiran ultrazvukom tijekom 30 minuta. Ultrazvuk je općenito povezan sa inaktivacijom stanica (Chisti, 2003). Međutim, prilikom predtretmana ultrazvukom dolazi do povećane permeabilnosti stanične membrane čime je omogućen jednostavniji ulaz supstrata i izlaz produkta iz stanice. Postoji mogućnost da je dio enzima iz stanice izašao u okolinu i ostao aktivan i izvan stanice što bi olakšalo i poboljšalo reakciju. Iz ovog istraživanja, može se zaključiti da ultrazvučni predtretman poboljšava efikasnost edukcije i dovodi do veće proizvodnje kiralnog spoja 1-(S)-(3,4-dimetilfenil)etanola.

5. Zaključci

U ovom radu ispitana je mogućnost primjene zelenih prirodnih eutektičkih otapala u redukciji 1-(3,4-dimetilfenil)etanona kataliziranoj pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* za dobivanje optički čistog kiralnog alkohola 1-(*S*)-(3,4-dimetilfenil)etanola. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

- Prirodna eutektička otapala na bazi kolin-klorida pripravljena su zagrijavanjem i miješanjem kolin-klorida i glukoze, odnosno glicerola ili etilen glikola u odgovarajućem omjeru uz 100 %-tno iskorištenje reakcije.
- U enantioselektivnim redukcijama svih supstrata prirodna eutektička otapala pokazala su se boljim odabirom od vode kao otapala budući da se ostvaruju veća konverzija i veći enantiomerni višak.
- Kao najpogodnije otapalo za enantioselektivnu redukciju odabrano je kolin-klorid:glicerol s 30 % (v/v) vode zbog najveće selektivnosti biokatalizatora.
- Predretman ultrazvukom povećava efikasnost redukcije i omogućava veće iskorištenje dobivanja kiralnog spoja 1-(*S*)-(3, 4-dimetilfenil)etanola, a najoptimalnijim se pokazao tretman od 30 minuta.

6. Popis literature

1. Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 9142–9147.
2. Ai Nguyen, L., He, H., Pham-Huy, C. (2006) Chiral Drugs: An Overview. *Int J Biomed Sci.* **2**: 85–100.
3. Kudłak B., Namieśnik J., Owczarek K. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 11975-11992.
4. Bommarius A. S., Riebel B. R. (2004) Biocatalysis. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. str. 2; 7; 30-34; 159-162; 188-189; 334.
5. Brnčić, M., Ježek, D., Markučić, D., Omelić, M., Tripalo, B. (2009a) Use of low-intensity ultrasound for foreign bodies determination in food system. *Hrvat. čas. prehrambeno tehnol. biotehnol. nutr.* **4**: 18-22.
6. Badanjak, M., Brnčić, M., Cerovec, P., Herceg Ljubić, I., Herceg, Z., Ježek, D., Rimac Brnčić, S., Šubarić, D., Tripalo, B. (2009b) Influence of power ultrasound on texture properties of corn starch gels. Proceedings of the 5 th ISFRS- International Symposium on Food Rheology and Structure, June 15-18, Zürich, Switzerland
7. Brnčić, M., Ježek, D., Karlović, D., Penava, A., Tripalo, B., Vikić Topić, D. (2009c) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvat. čas. prehrambeno tehnol. biotehnol. nutr.* **4**: (1-2), 32-37.
8. Chemat, F., Khan, M.K., Zill-e-Huma (2010) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* **18**: 813-835.
9. Cvjetko Bubalo M., Jokić S., Radojčić Redovniković I., Vidović S., (2015a) Green Solvents for Green Technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **90**: 1631 - 1639.
10. Cvjetko Bubalo M., Mazur M., Radošević K., Radojčić Redovniković I. (2015b) Baker's yeast-mediated asymmetric reduction of ethyl 3-oxobutanoate in deep eutectic solvents. *Process Biochemistry* **50**: 1788 - 1792.
11. Cvjetko M. (2012) Synthesis, application in biotransformations and cytotoxicity of selected imidazolium-based ionic liquids, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu.
12. Dai, J., Howarth, J., James, P. (2001) Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF₆ and water mix. *Tetrahedron Letters* **42**: 7517–7519

13. Drmić, H., Režek-Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**: 22-33
14. Baréa B., Dubreucq E., Durand E., Lecomte J., Piombo G., Villeneuve P. (2012) Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochemistry* **47**: 2081 - 2089.
15. Durand E., Lecomte J., Villeneuve P. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology* **115**: 379 - 385.
16. Faber K. (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6. izd., Springer. str. 1 - 268.
17. Fruchey, E.R. (2011) Asymmetric reductions of ketones, imines, and oximes using biocatalytic enzymes found in pea plants, Honors Research Thesis, The Ohio State University, Columbus, OH.
18. Ghisalba O., Meyer H.P., Wohlgemuth R. (2010) Industrial biotransformation. U: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, Flickinger M.C., John Wiley & Sons. str. 1-18.
19. Glieder, A., Pscheidt, B. (2008) Yeast cell factories for fine chemical and API production. *Microb. Cell Fact.* **7**:25
20. Grogan G. (2009a) *Practical Biotransformations*. A John Wiley and Sons, Ltd. str. 1 - 8, 147 - 151.
21. Grogan G. (2009b) *Practical Biotransformations: A Beginner's Guide*, John Wiley & Sons. str 4-6.
22. Holland H.L. (2002) Biocatalysis. U: *Handbook of Green Chemistry and Technology*, Clark J., Macquarrie D., Blackwell Science Ltd. str. 188-203.
23. Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Jukić M., Vorkapić-Furač J. (2004) "Zelena" kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kemija u industriji* **53**: 217-224.
24. Lancaster M. (2002) Principles of Sustainable and Green Chemistry. U: *Handbook of Green Chemistry and Technology*, Clark J., Macquarrie D., Blackwell Science Ltd. str. 10-26.
25. Deng D., Hu Y., Liang J., Zhang Y., Sun A. (2015) Enantioselective Resolution of (±)-1-Phenylethanol and (±)-1-Phenylethyl Acetate by a Novel Esterase from *Bacillus* sp. SCSIO 15121. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **3**: 558-575.

26. Aroso, I., Craveiro, R., Duarte, A. R. C. Martins, M., Paiva, P., Reis, R. L. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents - Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2**: 1063 - 1071.
27. Bates, D., Patist, A. (2008) Ultrasonics innovations in the food industry : From the laboratory to commercial production. *Innov Food Sci Emerg* **9**: 147-154.
28. Besse, P., Bolte, J., Veschambre, H. (1995) Bakers' Yeast Reduction of α -Diketones. *J. Chem. Educ.* **72**: 276-278.
29. De Oliveira Vigier, K., Jérôme, F., Royer, S., Zhang, Q. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**: 7108 - 7146.
30. Prelog, V. (1964) Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure and Applied Chemistry* **9**: 119-130.
31. Johannes, T., Simurdiak, M. R., Zhao, H. (2006) Biocatalysis, Encyclopedia of Chemical Processing str. 101-110
32. Alzamora, S. M Guerrero, S., Tognon, M. (2005). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control* **16**: 131-139.
33. Liu, J., et al. (2016) Effects of ultrasonication on increased germination and improved seedling growth of aged grass seeds of tall fescue and Russian wildrye. *Scientific reports* **6**, 22403.
34. Mortazavi, S. A., Tabatabaie, F., Yaldagard, M. (2008) The effect of ultrasound in combination with thermal treatment on the germinated barley's α -amylase activity. *Korean Journal of Chemical Engineering* **25**: 517-523
35. Chisti, Y. (2003) Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *TRENDS in Biotechnology* **21**: 89-93.
36. Abbott, A. P., Smith, E. L., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**: 11060–11082
37. Choi, Y. H., Dai, Y., van Spronsen, J., Verpoorte, R., Witkamp, G. J. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica chimica acta* **766**: 61-68.
38. Huang, C. H. (2017). Quantification of soil microtopography and surface roughness. *In Revival: Fractals in Soil Science* (1998) str. 161-176 CRC Press.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Gukov
Ana Gukov